

· 实验研究 ·

人参的抗氧化作用

中国协和医科大学基础部 冯立明 潘华珍

香港中文大学中药研究中心 李慧云 杨显荣

内容提要 本文采用多种方法在体外产生氧自由基,测定对红细胞的氧化作用,同时加入人参提取物,观察其对氧自由基的影响。实验结果表明:人参提取物有减少 O_2^- 及 $\cdot OH$ 对Hb的氧化,抑制 $\cdot OH$ 及 H_2O_2 引起红细胞的溶血及膜脂质过氧化作用;人参提取物还有清除 O_2^- 及 $\cdot OH$ 的功能及保护红细胞的作用。

人参作为延年益寿药物,在我国有着长期广泛的应用,对其作用原理,近年来也作了多方面的研究。人参中有效成分之一是人参皂甙,目前国内已有人应用人参皂甙作抗衰老作用的研究⁽¹⁾。关于衰老的理论有许多学说,其中自由基学说越来越受重视。红细胞由于其自身的特点:红细胞膜含有大量不饱和脂肪酸并经常接触高浓度氧;红细胞内含有大量Hb,在代谢过程中可产生氧自由基如超氧化物阴离子自由基(O_2^-)、氢氧自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2)。因此,红细胞很容易受氧自由基的损伤。本文以红细胞为对象,与外源性氧自由基作用,同时加入人参提取物,观察人参提取物是否有抗氧自由基的作用。

材料与方法

一、材料

1. 红细胞取自正常人静脉血,用PBS洗三次,实验时用PBS配成红细胞悬液,所有实验红细胞终浓度为1%。

2. 人参提取物为高丽参(白参)水提取液经冷冻干燥制得。1g原料用水提取后可得干粉(即人参提取物)200mg,由香港中文大学中药研究中心提供。所有实验终浓度均为0.05%。

3. 试剂:黄嘌呤氧化酶、次黄嘌呤、细胞色素C(IV型)、甲状腺素(T_4)均为Sigma产品。硫代巴比妥酸:BDH产品。过氧化氢:北京化学试剂厂产品。超氧化物歧化酶:苏州生化厂产品。

二、方法

1. O_2^- 对Hb的作用:用黄嘌呤氧化酶与次黄嘌呤体系产生 O_2^- ⁽²⁾,向此体系中加入2ml红细胞悬液,在37℃保温2小时,此为测定组;另外在测定组中加入人参提取物为加药组;无 O_2^- 产生条件即不加酶为对照组。保温后离心弃上清液,取0.1ml红细

胞加5ml蒸馏水破溶即为溶血液。剩余红细胞按Dodge法⁽³⁾制成红细胞膜悬液,取0.2ml悬液(含蛋白2mg/ml)⁽⁴⁾加4ml含0.1%十二烷基磺酸钠(SDS)磷酸缓冲液,pH7.4,然后用岛津UV-300双波长差值分光光度计,在500~700nm分别对溶血液和膜溶液进行扫描。

2. 人参提取物对 O_2^- 的影响:氧化型细胞色素C受 O_2^- 作用后转变为还原型细胞色素C,后者在550nm有吸收峰,测定细胞色素C还原率可反映 O_2^- 产生的多少⁽⁵⁾。在方法1 O_2^- 产生体系中加入细胞色素C(50 μ mol),另外再分别加入超氧化物歧化酶(SOD,200 μ g/ml)和人参提取物,在550nm读取OD值。

3. $\cdot OH$ 对红细胞的作用: $\cdot OH$ 的产生及其促使红细胞发生脂质过氧化与溶血的测定按Wall法⁽⁶⁾, $\cdot OH$ 对Hb影响的测定同方法1。同时加入人参提取物为加药组,平行测定。

4. H_2O_2 对红细胞的作用: H_2O_2 用pH7.3的PBS稀释(终浓度为100mmol),与红细胞悬液在37℃保温1小时,离心后测定上清液溶血度及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量⁽⁷⁾。

结 果

一、 O_2^- 对Hb的作用:红细胞受 O_2^- 作用后,溶血液中氧合Hb(540和575nm)减少,高铁Hb(630nm)增加,人参提取物有抗 O_2^- 对Hb的氧化作用(图1)。

红细胞与 O_2^- 作用后,将其制成红细胞膜,可见膜液中含有大量绿色素(Green pigment),在412nm有最大吸收峰。当有人参提取物存在时,绿色素减少(图2)。

二、人参提取物对 O_2^- 的影响:SOD是 O_2^- 的清除剂,保护细胞色素C不被还原。人参提取物对细

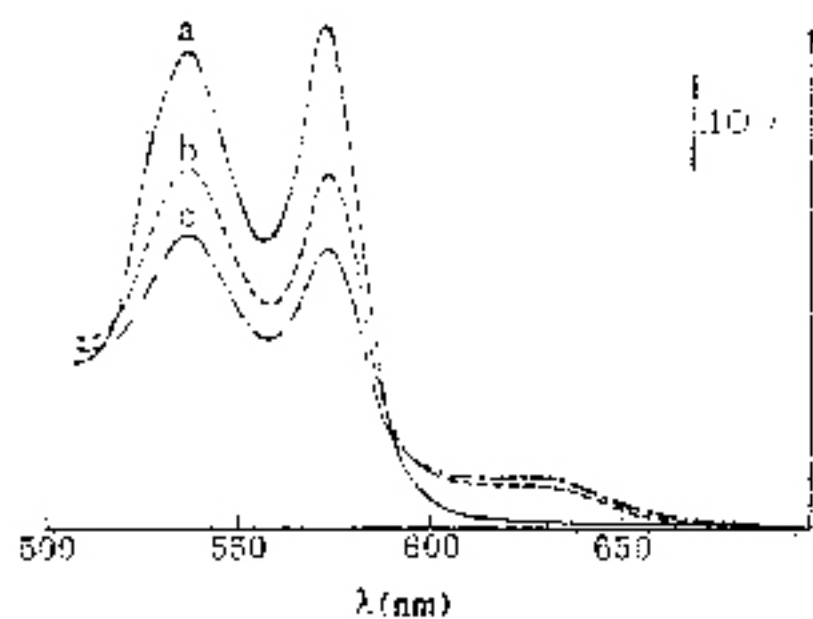


图1 人参抗 O_2^- 对 Hb 的氧化

a, 对照; b, RBC + O_2^- 产生体系 + 人参提取物;
c, RBC + O_2^- 产生体系。图为五次实验之结果

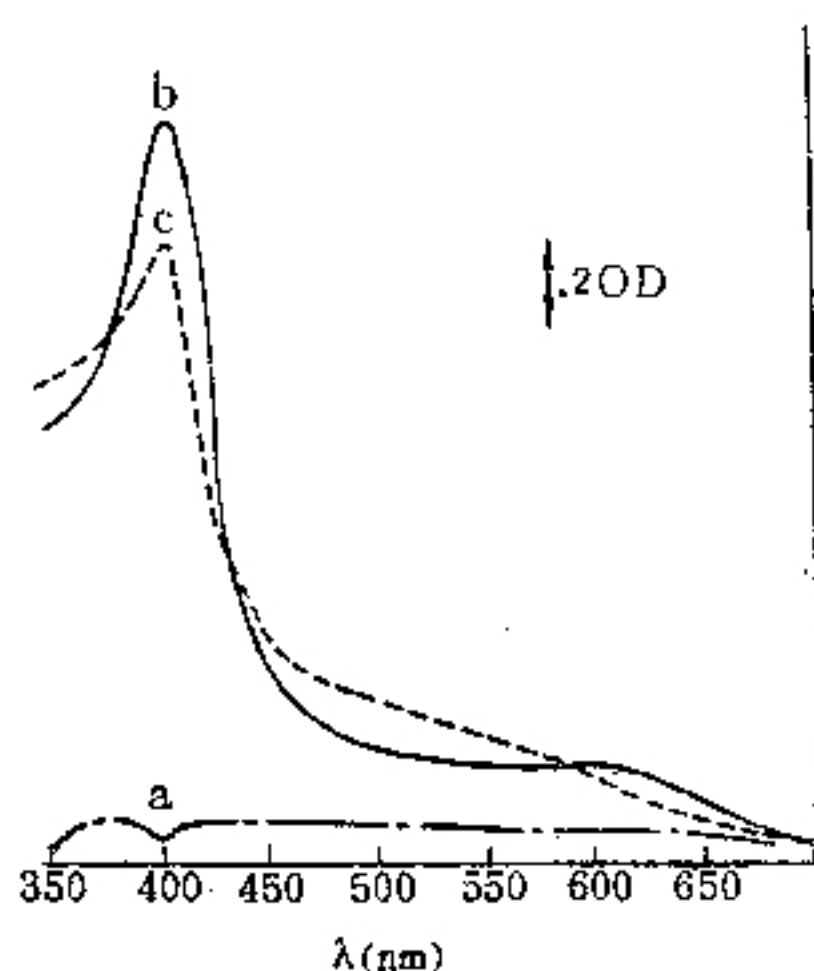


图2 O_2^- 对 Hb 与膜的影响

a, 对照; b, RBC + O_2^- 产生体系; c, RBC + O_2^- 产生体系 + 人参提取物。图为三次实验之结果

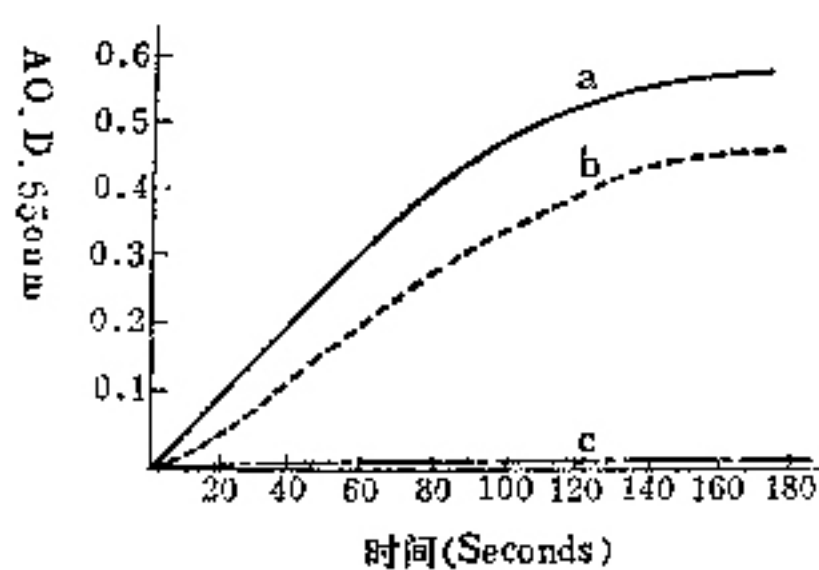


图3 人参对细胞色素 C 的保护

a, 细胞色素 C + O_2^- 产生体系; b, 细胞色素 C + O_2^- 产生体系 + 人参提取物; c, 细胞色素 C + O_2^- 产生体系 + SOD。图为五次实验之结果

胞色素 C 也有一定保护作用, 说明它有清除部分 O_2^- 的功能(图 3)。

三、 $\cdot OH$ 对红细胞的作用: 从图 4 可见 $\cdot OH$ 可使 Hb 氧化, 人参提取物有抗 $\cdot OH$ 的作用。对 $\cdot OH$ 促使红细胞溶血及脂质过氧化以及人参提取物抗 $\cdot OH$ 的作用也进行了测定, 10 例结果如下: 无人参提取物时, 溶血度为 $24.33 \pm 6.93\%$ ($M \pm SD$, 下同), MDA 含量为 $34.56 \pm 10.37 \text{ nmol/gHb}$; 当有人参提取物存在时, 溶血度下降为 $16.55 \pm 7.45\%$ ($P < 0.05$), MDA 含量减低为 $24.03 \pm 10.47 \text{ nmol/gHb}$ ($P < 0.05$)。

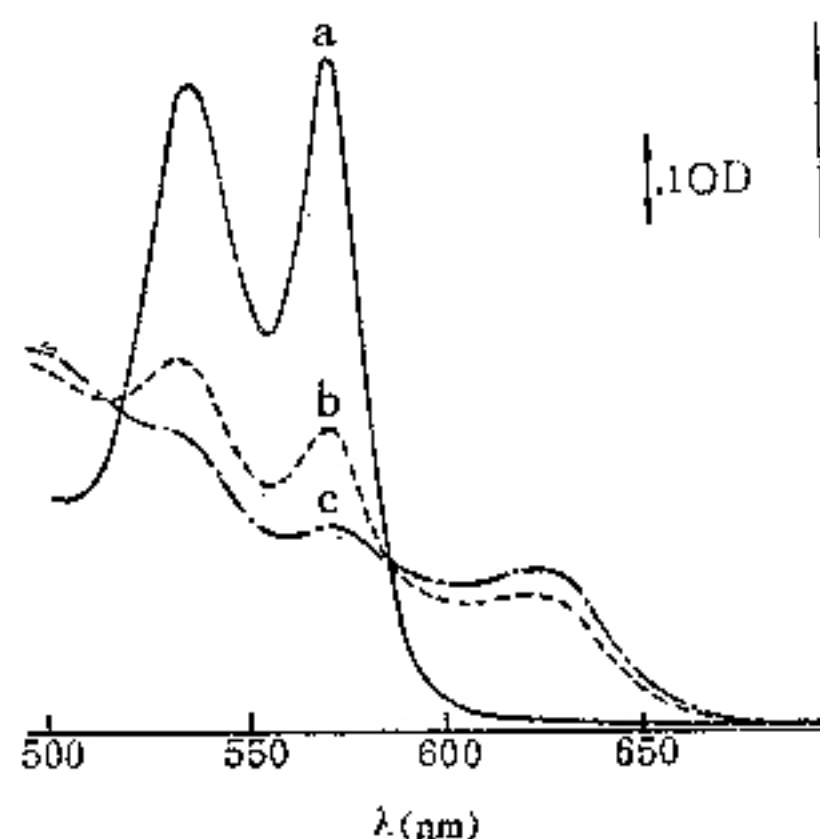


图4 人参抗 $\cdot OH$ 对 Hb 的氧化作用

a, 对照; b, RBC + $\cdot OH$ 产生体系 + 人参提取物;
c, RBC + $\cdot OH$ 产生体系。图为五次实验之结果

四、 H_2O_2 对红细胞的作用: H_2O_2 可使红细胞溶血及膜脂质发生过氧化, 人参提取物有抗 H_2O_2 的作用。10 例结果表明: 无人参提取物时, 溶血度为 $18.12 \pm 3.58\%$, MDA 含量为 $18.63 \pm 8.23 \text{ nmol/gHb}$; 当有人参提取物存在时, 溶血度下降为 $5.20 \pm 0.90\%$ ($P < 0.01$), MDA 含量下降为 $8.37 \pm 11.36 \text{ nmol/gHb}$ ($P < 0.05$)。

讨 论

在体内许多生理过程中, 都可产生 O_2^- 。 O_2^- 半衰期较长, 在机体中扩散距离也较远, 能对机体造成损伤。根据实验观察, O_2^- 与红细胞作用 20 小时以上才能使红细胞溶血。因此, O_2^- 首先使 Hb 氧化, 结果是氧合 Hb 减少, 产生了大量高铁 Hb。高铁 Hb 进一步转变为高铁血色原, 后者可与红细胞膜血型糖蛋白结合⁽⁷⁾。从图 2 结果看, 受 O_2^- 作用后, 红细胞膜含有大量绿色素, 在 412nm 有明显吸收峰, 这与氯高铁血红素(hemin)的吸收光谱相似⁽⁸⁾。当氯高铁血红素与红细胞膜结合后, 可改变收缩蛋白(Spectrin)及区带 4.1 蛋白的构象, 降低膜骨架蛋白结构稳定性, 损伤红细胞膜⁽⁹⁾。因此, 推测绿色素也能与红

细胞膜结合,使膜被损伤。在有人参提取物存在时,使膜色素减少,从而保护了膜结构稳定性。人参抗 O_2^- 的机理,可能由于它有清除 O_2^- 的能力。SOD是 O_2^- 的清除剂,有清除 O_2^- 的功能,保护细胞色素C不被还原。图3显示人参提取物可减少细胞色素C被 O_2^- 还原,说明它具有与SOD相似的功能,对 O_2^- 有清除作用。

$\cdot OH$ 是目前已知氧化能力最强的一个自由基。从结果可见,当它与红细胞作用2小时就可使红细胞产生溶血;Hb受严重氧化,氧合Hb几乎减少了三分之二,而生成大量高铁Hb;红细胞膜脂质发生过氧化。人参提取物有抗 $\cdot OH$ 的作用,它能减少Hb被氧化,降低红细胞溶血度及膜脂质过氧化。葡萄糖是 $\cdot OH$ 的清除剂,有清除 $\cdot OH$ 的功能⁽⁶⁾。我们曾同时测定人参提取物与葡萄糖抗 $\cdot OH$ 的溶血作用,发现两者均有降低 $\cdot OH$ 溶血的作用,说明人参提取物抗 $\cdot OH$ 的作用可能是发挥了作为 $\cdot OH$ 清除剂的结果。

H_2O_2 也可使红细胞溶血及膜脂质发生过氧化,人参提取物也有抗 H_2O_2 作用。我们曾测定加入人参提取物前后 H_2O_2 的含量,结果发现 H_2O_2 含量无变化,说明人参提取物不能使 H_2O_2 分解。推测人参提取物抗 H_2O_2 的作用有二:一是它能保护红细胞;二是它能阻碍 H_2O_2 与红细胞起反应。

综上所述,人参提取物对氧自由基有对抗作用,为其作为抗氧化药物提供了依据。进一步对人参提取

物中有效成分进行研究,将有利于发挥其效力。

(本实验工作由中国科学院科学基金资助)

参 考 文 献

1. 霍玉书,等. 人参果皂甙抗衰老作用的临床研究. 中医杂志 1983; 10: 39.
2. Bartosz G. et al. Effect of hyperoxide radicals on bovine-erythrocyte membrane. Eur J Biochem 1977; 73: 261.
3. Dodge ZT. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1963; 100: 119.
4. Lowry OH. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265.
5. Hebbel RP. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. J Clin Invest 1982; 70: 1253.
6. Walls R. et al. Aging of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1976; 174: 463.
7. Waugh SM. et al. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. Biochemistry 1985; 24: 34.
8. Glodberg B. et al. The role of superoxide anion as a toxic species in the erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1977; 178: 218.
9. Liu SC. et al. Hemin-mediated dissociation of erythrocyte membrane skeletal proteins. J Bio Chem 1985; 260: 12234.

红川参六味汤治疗 60 例冠心病疗效分析

兰州部队总医院 李海旺 杜桂珠 张振科

我们根据冠心病出现程度不等的气滞血瘀或痰滞血瘀表现,拟定活血化瘀、益气补虚之红川参六味汤进行治疗,收到较好效果,报告如下。

一般资料 60例患者均按1974年全国冠心病座谈会标准确诊。全为男性脑力劳动者,年龄45~71岁。病程6个月至10年。

治疗方法 方剂组成:红花15g 川芎12g 丹参30g 制首乌30g 赤芍15g 葛根15g。每日一剂,水煎两次混合分两次服。30天为一疗程,服1~2疗程者54例。

结果 以症状控制,心电图ST-T缺血改变恢复或压低达 $<0.5mm$ 为显效;以症状明显改善,心电图ST-T缺血改变好转为改善。结果:47例有心绞痛症状者,治疗后显效25例(53.19%);改善者14

例(29.78%),总有效率82.97%。静息心电图有对比的24例中,显效7例(29.17%),有效10例(41.66%),总有效率70.83%。双倍二阶梯运动试验对比的35例中,显效26例(74.28%),改善3例(8.57%)。另外,40%患者胆固醇、 β -脂蛋白、三酸甘油酯有不同程度降低(45.83~58.62%)。其中33例2~4年内通过门诊及再次住院随访检查,疗效仍稳定在69.69%。

讨论 冠心病临床表现虽多有气滞、痰滞、血瘀,但系标实本虚。活血化瘀、益气补虚、标本同治在于改善心脏供血和提高心功能。有资料证明川芎、丹参均能解血小板和血球聚集现象,改变血液流态,有助于改善微循环;红花可减慢心率、降低氧耗,赤芍可对抗心肌缺血、增强耐氧;葛根有减低血管阻力等协同作用,因而能取得较快而稳定持久的疗效。

The Anti-oxidant Action of *Panax ginseng*

Feng Liming (冯立明), Pan Huazhen (潘华珍), Li Waiwan* (李慧云), et al

Peking Union Medical College, Beijing

*Chinese Medicinal Material Research Centre, Chinese University of Hong Kong

The effect of *Panax ginseng* to prevent erythrocytes from oxidation caused by oxygen free radical is presented in this paper. When erythrocytes were exposed to oxygen free radical generated in vitro, hemoglobin breakdown, and lipid peroxidation as well as hemolysis occurred. These reactions could be inhibited by *Panax ginseng* preparations. *Panax ginseng* could act as a scavenger of superoxide anion (O_2^-) and hydroxy radical ($\cdot OH$); it also can protect erythrocytes from oxidation induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). The results showed that *Panax ginseng* might be possibly used as an anti-aging drug.

(Original article on page 288)

Experimental Study of PAC Injection in Preventing and Treating Endotoxin Shock in Rats

Zhang Chenfu (张陈福), et al

Shanghai College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

53 Wistar rats were used for investigating the effect of PAC (*Panax ginseng*, *Aconitum carmichaeli*, *Citrus tangerina*) injection on endotoxin shock. (1) Immediately after the endotoxin (4 mg/kg per rat) were injected intravenously into all animals, group A received 3 ml PAC injection given i.v. dripping, while group B received the same amount of saline. It revealed that the blood pressure of group A remained normal but that of group B was lowered significantly (t test: 15' t=1.077, P>0.05; 30' t=1.983, P>0.05; 45' t=3.21, P<0.01; 60' t=3.7, P<0.01). (2) After an injection of 4 mg/kg endotoxin, their blood pressure gradually dropped to 80 mmHg. And then group A received PAC injection and group B the saline. It was found that the blood pressure was normalized after PAC injection, while saline proved to be ineffective (t test: 15' t=5.73, P<0.001; 30' t=4.675, P<0.001; 45' t=3.74, P<0.01; 60' t=3.436, P<0.01). (3) Endotoxin was given via external jugular vein to all animals, and PAC was dripped into femoral vein of group A and normal saline to those of group B simultaneously. The change of mesenteric arteriole lumen was observed and measured by means of close circuit TV system. After 90 minutes, it was found that the change was $15.41 \pm 2.96 \mu m$ in group A, and $12.08 \pm 2.57 \mu m$ in group B (P<0.05). After 120 minutes it was $15.27 \pm 2.65 \mu m$ and $11.25 \pm 2.25 \mu m$ respectively (P<0.01). These data indicated that PAC injection was effective not only in preventing and treating endotoxin shock in rats, but also in inhibiting the constriction of mesenteric arteriole caused by endotoxin.

(Original article on page 291)

Anti-Inflammatory Effect of Tong Guan Decoction (通管汤) on Rabbit's Chemical Salpingitis

Li Ling (李玲), et al

Shanghai TCM College, Shanghai

Phenol-induced chemical salpingitis of rabbit was chosen as experimental model. Two groups were formed. Tong Guan decoction (通管汤) group and control group. After medication, pathological examination was done on both groups. The result of the experiment has proved that Tong Guan decoction was effective on chemical salpingitis. The difference between these two groups was significant statistically, (with Ridit method, 95% believable limit was no interlock). The effect was brought about by improving the cell metabolism, inhibiting the hyperplasia of fibrocytes and reducing the infiltration of inflammatory cells. The difference was also significant between these groups both in salpingian epithelium, submucous and serous membrane. The indices concerning rabbit's hemorheology were also analysed before and after medication. It indicated that Tong Guan decoction could improve the viscosity of blood and aggregation of blood cell. The blood flow was increased in inflammatory area, and the circulatory disturbance was corrected. The differences of the indices between pre- and post-treatment were significant, P<0.05 and P<0.001.

(Original article on page 293)